

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780314

研究課題名（和文）転写因子の翻訳後調節を介した植物の乾燥・高温ストレス伝達機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of a mechanism of dehydration or heat stress signal transduction in plants through post-translational regulation of a transcription factor

## 研究代表者

溝井 順哉（MIZOI JUNYA）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任助教

研究者番号：20469753

研究成果の概要（和文）：植物が乾燥や高温といった環境ストレスに応答して耐性を高める機構を明らかにするため、シロイヌナズナにおいて、これらの環境ストレスに応答し、ストレス耐性遺伝子の発現を活性化する重要な転写因子 DREB2A に着目し、その翻訳後調節機構の解析を行った。多数の植物の相同遺伝子との配列比較や、部位特異的変異による活性変化の解析から、セリン・トレオニンのクラスターを中心とした領域が DREB2A タンパク質の活性化にとって重要であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Plants increase tolerance to environmental stresses such as drought or heat in response to these stress stimuli. We analyzed the mechanism for the post-translational regulation of the transcription factor DREB2A in the stress response of Arabidopsis. We compared amino acid sequences among DREB2A orthologs in many plant species and analyzed the effects of site-directed mutagenesis on transcriptional activity of DREB2A. From these analyses, a core region that has a serine/threonine cluster was shown to be important for post-translational activation of the DREB2A protein.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学、応用分子細胞生物学

キーワード：発現制御・植物・ストレス応答・転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

世界の耕地の多くでは、農業生産が環境ストレスに左右されている。特に熱帯や亜熱帯の途上国においては、乾燥や高温のストレスが食料生産を制限し、飢餓や貧困を引き起こす要因となっている。また、地球人口が増え

続けるなか食料を安定に供給するには、灌漑設備の不十分な地域における干ばつの影響を最小限にとどめることが重要である。したがって、乾燥や高温ストレスに耐性をもつ作物の開発が急務であるが、その手段としては分子育種的な手法等を用い、植物が元来持つ

ている耐性獲得システムを強化することが作物の乾燥・高温耐性を上昇させるために有効であると考えられる。そのためには、植物の乾燥・高温ストレス耐性獲得システムを分子生理学のレベルで理解することが必要である。

植物に特有な転写因子の DREB ファミリーは、AP2/ERF 型転写因子の一種で、ストレスに応答した耐性遺伝子群の発現をつかさどっている。実際に、組換え技術を用いた DREB 遺伝子の機能発現により植物のストレス耐性が高まること、イネやシロイヌナズナをはじめとした植物で示されている [1, 2]。シロイヌナズナの DREB ファミリー転写因子のうち、乾燥・高温ストレス応答における耐性遺伝子の発現には DREB2A が関与しているが [1]、DREB2A の機能発現のためには、タンパク質発現に続けて活性化が必要である [3, 4]。最近、DREB2A はユビキチン-プロテアソーム系による分解制御を受けていることが明らかになり、E3 ユビキチンリガーゼの DREB2A 結合タンパク質 (DRIP) が単離された [5]。DRIP が DREB2A 以外に発現に関与するタンパク質も標的としていること、DREB2A が活性化されるようなストレス条件下でも DREB2A は分解されていることが示唆されたことから、分解制御とは別にストレスシグナルを受けた活性化プロセスが存在する可能性が考えられる。

DREB2A タンパク質には負の活性調節領域 (NRD) が存在し、この領域を欠失させると、DREB2A は構成的に高い活性を示すようになることから、NRD は非ストレス条件下で DREB2A を不活性化するのに必要な領域であると考えられる [3]。NRD は半減期の短いタンパク質に含まれる PEST 配列としての要件を満たしており、少なくとも DREB2A の安定性を低くしていることが明らかになっている [3]。一方、NRD による不安定化および負の活性調節能は、ストレスシグナルにより制限されると予想されるが、その機構は明らかになっていない。しかしながら、このようなタンパク質レベルでの活性制御は、環境変化に対する、素早く適切な応答に寄与すると考えられ、また、その理解は、植物のストレスシグナル伝達の最上流過程の解明につながると期待される。

## 2. 研究の目的

以上のような背景から、本研究では DREB2A の翻訳後の活性調節機構を明らかにするために、DREB2A タンパク質の蓄積レベルと活性の関係を明らかにすること、また、翻訳後修飾の可能性を考え、NRD による負の活性調節に必要なアミノ酸配列の要件を決定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 細胞内における DREB2A タンパク質のレベルを調べるため、大腸菌で発現させた DREB2A のタンパク質断片を抗原として抗血清を取得し、抗原を用いて特異的抗体をアフィニティ精製した。用いた断片は、相同遺伝子との相同性が低いカルボキシル末端側の領域に相当する。これらの抗体を用いて、野生型および、*DREB2A* 遺伝子を構成的に発現する形質転換体のシロイヌナズナにおける、ストレス条件下での DREB2A タンパク質蓄積量の解析を行った。また、シロイヌナズナの葉肉から調製したプロトプラストにおいて DREB2A を一過的に発現させたうえで、ストレス処理を行い、DREB2A タンパク質の蓄積量の変化および、それに伴うレポーター活性の変化を調べた。

(2) DREB2A タンパク質の機能上重要な配列を調べるため、他の植物由来の DREB2A 相同タンパク質 (DREB2 型転写因子) との配列の比較を行った。まず、これまでにデータベースに登録されている DREB2 型転写因子の配列を比較し、共通配列を見出した。次に、ゲノム配列が明らかになっている 25 種の植物 (被子植物 21 種、シダ植物 1 種、コケ植物 1 種、緑藻 2 種) において存在が予測されている AP2/ERF 型転写因子の配列をすべて取得して分子系統解析を行い、DREB2 型転写因子を抽出した。さらに、DREB2 型転写因子をコードしている EST 配列も収集した。これらの配列から NRD 様の配列を持っている群を抽出し、NRD 様配列の比較を行った。

(3) 上記の分子系統解析の結果の妥当性を、イネおよびダイズにおける DREB2 型転写因子の発現解析および転写活性の測定から検証した。また、シロイヌナズナにおいて DREB2A と最も配列の相同性が高いが、NRD の配列が一部違っているタンパク質である DREB2B に着目し、NRD の安定性制御および活性制御に関する機能の比較を行った。

(4) NRD 様配列の比較解析結果をもとに、NRD に含まれるアミノ酸配列の一部を欠失または置換させた変異型 DREB2A の活性を測定し、NRD において重要なアミノ酸配列の推定を行った。

## 4. 研究成果

(1) 大腸菌で発現させた組換え DREB2A タンパク質を抗原として抗 DREB2A 抗体を作製し、シロイヌナズナの植物体で発現している内生の DREB2A タンパク質、葉肉プロトプラストで一過的発現させた DREB2A タンパク質を検出する系を確立した。DREB タンパク質は細胞内での存在量が少なく、これまでに DREB2A

をはじめとする内生の DREB 転写因子を検出できる抗体は報告されていなかったが、この抗体を使うことで、植物体内での DREB2A タンパク質の動態を直接調べることができるようになった。

野生型のシロイヌナズナでは、高温あるいは乾燥ストレスにより DREB2A タンパク質が蓄積することが確認され、その蓄積量は高温ストレスにおいて著しく多かった。DREB2A は乾燥ストレス時には、高温時とは異なるターゲット遺伝子の発現を活性化するので[4]、乾燥ストレスと高温ストレスでは、DREB2A の活性発現機構が違っていることが示唆されるが、このような蓄積パターンの違いは、このことを支持している。

また、DREB2A を一過的に発現しているプロトプラストに対し、培地の温度あるいは浸透圧を上げる処理を行ったところ、一過的に DREB2A タンパク質の蓄積量が上昇した。このことは、DREB2A タンパク質の安定性が高温あるいは浸透圧ショックにより、一過的に向上することを示唆している。高温ショックや浸透圧ショックを加えた時の DREB2A タンパク質の蓄積量はプロテアソーム阻害剤 MG132 を作用させた場合に匹敵していたので、これらのストレス条件下では、DREB2A タンパク質のプロテアソームによる選択的分解が、ほぼ完全に停止しているのではないかと考えられた。以上の解析については、学会発表⑩、⑪で発表している。

DREB2A が蓄積するような条件下で、DREB2A の活性化が起きているか調べるために、DREB2A の結合配列である DRE を持つプロモーターにレポーター遺伝子をつなぎ、プロトプラストに DREB2A と同時に導入して、ストレス処理後、レポーター活性を測定した。その結果、レポーター活性はストレスの有無にかかわらず、変化しなかったため、DREB2A の安定化と活性化は同じ現象ではないことが示唆された。

ストレスシグナルによる DREB2A タンパク質の安定化を植物体で確認するため、*DREB2A* 遺伝子を恒常的に発現する形質転換シロイヌナズナに高温あるいは乾燥処理を行ったところ、いずれのストレス処理によっても DREB2A タンパク質の蓄積量が高まったことから、植物体内においても、ストレス処理により DREB2A タンパク質の安定性が向上することが確かめられた(学会発表②、④、⑧)。

(2) これまでにデータベースに cDNA 配列が登録されている DREB2 型転写因子の配列を収集して比較解析を行い、AP2/ERF 型 DNA 結合ドメインの直前に共通の保存配列 (Conserved domain 2, CD2) を見出した。

さらに、25 種類の植物のゲノムデータベースから AP2/ERF 型転写因子の予測配列を取得

し、CD2 を持っていることを基準に DREB2 型転写因子を抽出した。その結果、DREB2 型転写因子は、緑藻には存在しないが、祖先的なコケ植物で既に獲得されていたことが示された(文献①)。DREB2 型転写因子はさらに 4 つのサブタイプに分けられ、全ゲノム配列が明らかになっている被子植物はすべて、4 つのサブタイプの遺伝子を持っていることが明らかになった。DREB2A が属するサブタイプ (サブタイプ 1) のメンバーは、CD2 のさらにアミノ末端側にもう 1 つの保存配列 (Conserved domain 1, CD1)、さらに DNA 結合ドメインのカルボキシル末端側に 2 か所の保存配列を持っていることが見出され、このうち 1 か所は、DREB2A の NRD に類似した配列であった。

(3) シロイヌナズナにおいては、4 つのサブタイプのうち、サブタイプ 1 の DREB2 型転写因子がストレス条件下で誘導され、ストレス応答に関与している。他の植物でもサブタイプ 1 の DREB2 型転写因子がストレス応答に関係していることを、イネにおける DREB2 型転写因子の網羅的な解析によって確認した(文献④、学会発表⑦、⑪、⑬)。イネには、6 個の DREB2 型転写因子が存在する。これらのうち、サブタイプ 1 に属する *OsDREB2A* と *OsDREB2B* のみが、浸透圧、高温ストレスに対して顕著な誘導性を示した。さらに、*OsDREB2B* はカルボキシル末端側の保存配列を両方保持しており、典型的なサブタイプ 1 の DREB2 型転写因子だと考えられた。*OsDREB2B* は、プロトプラスト一過的発現系において、シス配列 DRE を介してレポーターの発現を活性化した。また、*OsDREB2B* を導入した形質転換シロイヌナズナでは、乾燥や高温に応答する遺伝子の発現が上昇し、これらのストレスに対する耐性が向上していた。

また、ダイズにおいても、ストレス処理した植物における DREB2 型転写因子の誘導性を、所属する研究グループにおけるマイクロアレイの結果[6]を用いて調べたところ、サブタイプ 1 に属する *GmDREB2A;1*、*GmDREB2A;2*、*GmDREB2D;1*、*GmDREB2D;2* が高い誘導性を示すことが明らかになった(学会発表③、⑨)。*GmDREB2A;1*、*GmDREB2A;2* も、カルボキシル末端側の保存配列を両方保持している、典型的なサブタイプ 1 の DREB2 型転写因子である。さらに、これまでに単離されたストレス誘導性の DREB2 型転写因子はすべてサブタイプ 1 に属していた。以上の比較解析から、NRD 様配列を含む典型的なサブタイプ 1 のメンバーが、DREB2 型転写因子の中でもストレス応答に強く関与している因子であると考えられた。

(4) 以上の結果を踏まえ、EST 等にコードさ

れる予測配列も含めて DREB2A と同じサブタイプ 1 に属する DREB2 型転写因子の配列をさらに大規模に収集し、NRD に類似した配列の特徴を解析した。その結果、セリン・トレオニンのクラスターを中心とした、親水性が高い配列構造が保存されていた。

DREB2A において、セリン・トレオニンのクラスターを含む領域は NRD のアミノ末端側に相当する。この領域だけを欠失させた DREB2A は、一過的発現系で DREB2A CA と同等の活性を示したことから、このセリン・トレオニンクラスターは、NRD の中核領域として機能することが示唆された。シロイヌナズナにおいて DREB2A と最も相同性が高いタンパク質である DREB2B についても、同様な実験を行い、セリン・トレオニンクラスターを含む領域が NRD の中核領域として機能することを確認した。

セリン・トレオニン残基は、リン酸化の基質となり、翻訳後調節に関与するケースがあり、その場合、これらの残基をアラニン、アスパラギン酸に置換することで、それぞれ構成的非リン酸化型、構成的リン酸化型を偽装できることがある。そこで、DREB2A の NRD に存在する様々な残基について、アラニンあるいはアスパラギン酸への置換を施した。その結果、特定のセリン・トレオニン残基の変異が活性に大きな影響を及ぼすことはなかったが、いずれのアミノ酸置換も、負の活性調節を弱くする傾向が認められた。その効果は、セリン、トレオニン>親水性残基>疎水性残基の順に大きく、アラニンへの置換の方が、アスパラギン酸への置換に比べて効果が大きかった。以上の解析から、DREB2A の NRD による翻訳後調節においては、セリン、トレオニンのクラスターが重要な機能を担っているが、少なくとも単純なリン酸化だけで制御されているのではないという可能性が考えられた。一方、高い親水性は PEST 配列の成立要件の一つであることから、PEST 配列として DREB2A タンパク質を不安定化することが NRD の重要な作用の一つであることが裏付けられた。以上の解析については、学会発表⑤、⑥、⑭で発表した。セリン・トレオニンが重要であることは、翻訳後修飾による活性調節の可能性を示唆しており、今後はこの可能性を追求していく計画である。

[1] Liu et al. (1998) Plant Cell 10: 1391-1406

[2] Ito et al. (2006) Plant Cell Physiol 47: 141-153

[3] Sakuma et al. (2006a) Plant Cell 18: 1292-1309

[4] Sakuma et al. (2006b) Proc Natl Acad Sci USA 103: 18822-18827

[5] Qin et al. (2008) Plant Cell 20:

1693-1707

[6] Maruyama et al. (2012) DNA Res 9: 37-49

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

① Mizoi, J., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011) AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. BBA - Gene Regul. Mech. 1819: 86-96. [doi:10.1016/j.bbagr.2011.08.004]、査読有

② Qin, F., Kodaira, K., Maruyama, K., Mizoi, J., Tran, L.-S.P., Fujita, Y., Morimoto, K., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011) SPINDLY, a negative regulator of GA signaling, is involved in the plant abiotic stress response. Plant Physiol. 157: 1900-1913. [doi:10.1104/pp.111.187302]、査読有

③ Kim, J.-S., Mizoi, J., Yoshida, T., Fujita, Y., Nakajima, J., Ohori, T., Todaka, D., Nakashima, K., Hirayama, T., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011) An ABRE promoter sequence is involved in osmotic stress-responsive expression of the DREB2A gene, which encodes a transcription factor regulating drought-inducible genes in Arabidopsis. Plant Cell Physiol. 52: 2136-2146. [doi:10.1093/pcp/pcr143]、査読有

④ Matsukura S, Mizoi J., Yoshida T, Todaka D, Ito Y, Maruyama K, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2010) Comprehensive analysis of rice DREB2-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes. Mol Genet Genomics. 283: 185-196 [doi:10.1007/s00438-009-0506-y]、査読有

[学会発表] (計 21 件)

① 溝井順哉、緑色植物における AP2/ERF 転写因子の分子系統解析、第 53 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 16 日、京都

- ② 森本恭子、環境ストレス応答におけるシロイヌナズナの DREB2A タンパク質の安定性の解析、2012年3月16日、京都
- ③ 大堀鉄平、ダイズの環境ストレス応答に関する DREB2A 相同遺伝子の機能解析、第52回日本植物生理学会年会、2012年3月16日、京都
- ④ Kyoko Morimoto, Analysis of the relationship between stabilization and activation of the Arabidopsis transcription factor DREB2A under environmental stress. 第34回日本分子生物学会年会、2011年12月13日、横浜
- ⑤ Junya Mizoi, Comparative functional analysis of DREB2A and DREB2B in Arabidopsis. The 22nd International Conference on Arabidopsis Research、2011年6月23日、米国・マディソン
- ⑥ 溝井順哉、シロイヌナズナにおける相同な環境ストレス応答性転写因子 DREB2A と DREB2B の比較解析、第52回日本植物生理学会年会、2011年3月21日、仙台
- ⑦ 松倉智子、イネの DREB2 型転写因子 OsDREB2B の機能解析、第52回日本植物生理学会年会、2011年3月21日、仙台
- ⑧ 森本恭子、シロイヌナズナの転写因子 DREB2A の環境ストレスに応答した安定化と活性化に関する解析、第52回日本植物生理学会年会、2011年3月21日、仙台
- ⑨ 大堀鉄平、ダイズの環境ストレス応答に関する DREB2A 相同遺伝子の機能解析、第52回日本植物生理学会年会、2011年3月21日、仙台
- ⑩ Junya Mizoi, Analysis of a stress-responsive stabilization mechanism of Arabidopsis DREB2A. The 21st International Conference on Arabidopsis Research, 2010年6月7日、横浜
- ⑪ Satoko Matsukura, Comprehensive analysis of rice DREB2-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes. The 21st International Conference on

Arabidopsis Research, 2010年6月7日、横浜

- ⑫ 溝井順哉、シロイヌナズナの転写因子 DREB2A のストレスに応答した安定化機構の解析、第51回日本植物生理学会年会、2010年3月21日、熊本
- ⑬ 松倉智子、イネの環境ストレス応答に関与する DREB2 型転写因子の機能解析、第51回日本植物生理学会年会、2010年3月21日、熊本
- ⑭ 安田奈保美、シロイヌナズナの乾燥と高温ストレス誘導性遺伝子の発現制御機構における DREB2B 遺伝子の機能解析、第51回日本植物生理学会年会、2010年3月21日、熊本
- ⑮ Junya Mizoi, A search for common regulatory elements of DREB2-type transcription factors based on a molecular phylogenetic analysis. The 9th International Plant Molecular Biology Congress, 2009年10月28日、米国・セントルイス

〔図書〕(計1件)

- ① 溝井順哉・篠崎和子、シーエムシー出版、「乾燥にも高温にも強い環境ストレス耐性植物の開発」名誉監修：吉田和哉、監修：植田充美、福崎英一郎「第二世代バイオ燃料の開発と応用展開」、2009、95-102

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

溝井 順哉 (MIZOI JUNYA)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任助教

研究者番号：20469753

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：